

## **· 分担研究者報告**



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部  
キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

研究分担研究課題：化学物質の臨界期曝露による視床下部キスペプチンの変化と  
遅発影響の閾値の関連性

研究分担者：高橋美和 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部  
研究協力者：市村亮平 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部  
吉田 緑 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

### 研究要旨

最終年度である今年度は以下の2点について解析を行った。

1. エストロゲン作用物質の新生児期曝露は、視床下部の生殖機能中枢変調を介して性周期早期異常や子宮がんリスク等雌性生殖器機能へ遅発性の悪影響を及ぼす。本年度は動物種・組織により異なるエストロゲン/抗エストロゲン作用を示す selective estrogen receptor modulator (SERM)の新生児期曝露による遅発影響誘発の有無とその機序を解析した。その結果、ラット子宮に抗エストロゲン作用を示すタモキシフェン(TMx)およびラロキシフェン(RLx)それぞれのラット新生児期単回曝露は、エストロゲン同様、視床下部キスペプチンニューロンを変調させ神経内分泌機能の異常を介して遅発影響を誘発することが明らかとなった。同量比較では TMx のほうが視床下部への影響は強かった。
2. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の発現機序について adverse outcome pathway (AOP)の構築を進めた。本研究の成果より、遅発影響の AOP は、視床下部サージ中枢キスペプチンニューロン抑制を molecular initiating event として、正常性周期より認められる LH サージ低下を key event に、AO には繁殖生涯への悪影響として性周期異常の早期発現を提案予定することが妥当であると結論した。本研究班の成果を踏まえ、既存の毒性試験ガイドラインでは検出できない可能性の高い化学物質の新生児期ばく露に起因する遅発影響を検出するための既存の OECD テストガイドライン改善点について提言した。

### A. 研究目的

化学物質の臨界期曝露による遅発影響は、現行の毒性試験では検出が困難であり、リスク評価上の課題となっている。

先行研究において、生後0日の雌性 Wistar Hannover ラットに 0.02 ~ 200 µg/kg の 17α-ethynylestradiol (EE) を単回皮下投与すると、性成熟後に遅発影響として 0.2 µg/kg 以上で性周期（排卵）の早期停止を起こすことを (Takahashi et al., 2013)、これらの新生児期曝露を受けたラットでは、性周期の早期異常発現に先立ち排卵制御中枢である視床下部前腹側周囲核 (AVPV) におけるキスペプチンニューロンの機能低下が生じていること (Usuda et al., 2014; Ichimura et al., 2015a)、および遅発影

響を起こす臨界期が脳性分化の高感受性期と考えられてきた生後0から5日ではなく生後10日曝露でも遅発影響が引き起こされることを報告した (Ichimura et al., 2015b)。AVPV のキスペプチンニューロンではエストロゲン受容体 (ER) の発現低下が同時に認められたため ER の変調が同ニューロンの変化の引き金である可能性が示唆された。

そこで本年度はエストロゲン作用が遅発影響誘発に必須であるのか、抗エストロゲン物質も遅発影響を誘発可能なのか明らかにするため、selective estrogen receptor modulator (SERM) であるタモキシフェン (TMx) とラロキシフェン (RLx) をこれまでの研究と同様のプロトコルを用いてラット新生児に単回曝

露してキスペプチンの変化と支配下領域の生殖器の変化を検索した。

今年度の2点目の研究として、本研究により明らかになりつつある新生児期エストロゲン類曝露と遅発影響の機序と関連性をまとめるため、近年毒性発現機序を引き金からキーイベントを経て最終的な有害性に至るまでを記す概念図である adverse outcome pathway (AOP) (OECD, 2013; Villeneuve et al., 2014a,b) を遅発影響にあてはめ、遅発影響全体の流れ図の作成を試みた。また本研究班の成果を踏まえ、既存の毒性試験ガイドラインでは検出できない可能性の高い化学物質の新生児期ばく露に起因する遅発影響を検出するため、既存の OECD テストガイドラインをどのように改善すべきか提言を試みた。

## B. 研究方法

### B-1. SERM 新生児期曝露による遅発影響誘発の可能性とその機序検索

**実験1:** 生後24時間以内(PND0)のDonryu新生児雌ラットにTMX 10mg/kg bw、RLX 0.1, 1あるいは10 mg/kg bwを単回皮下投与し、対照群には溶媒であるセサミオイルのみを投与した。投与量は新生児期曝露により影響があると報告されている量を選択した(Pinilla et al., 2001; Pinilla et al., 2002)。遺伝的な因子を最小化するため同じ投与群の新生児は、投与後1腹雌雄併せて10匹ずつとなるよう無作為化して異なる母動物に哺乳させた。新生児雄にも同様の処置を施した。離乳後、1群あたり雌26匹を用いた。これらの雌は膣開口による性成熟および性周期等を観察し、10週齢にて各群10匹ずつを視床下部キスペプチンおよびLHサージの検索に用いた。すなわち、卵巣を摘出後、エストロゲンベンゾエート(EB)3日間とプロゲステロン(P4)最終日投与により人工サージを誘発し、試験実施設内の環境でLHサージ時刻と予想される夕方4時に剖検した。RIA法で血中黄体形成ホルモン(LH)および卵巣刺激ホルモン(FSH)を測定した。視床下部の部位別のキスペプチンの変化を観察するため、AVPVを含む視床下部前方と弓状核(ARC)を含む視床下部後方に分けて各部位のキスペプチン関連の遺伝子の変化(Kiss1, Kiss1receptor (Kiss1R), Gonadotropin

Releasing Hormone 1 (GnRH1、AVPVのみ)等をRT-PCR法で測定した(各群5例)。また形態学的にキスペプチンの変化を観察するため脳をバラホルムアルデヒドで還流固定後凍結し連続切片を作成してAVPVおよびARCに存在するKiss1遺伝子をin situ hybridization(ISH)法で検出し、ER $\alpha$ 抗体による免疫組織化学染色との二重染色を施し、それぞれの核における陽性細胞数を測定した(各群最大5匹)。これらの方法は以前の報告と同様の手法である(Ichimura et al., 2015a,b)。

残りの動物は26週齢まで性周期の変化について観察した。性周期観察は、5日間連続で膣スミアを採取し4~5日周期で定期的に発情が回帰する場合を正常性周期、それ以外を異常性周期に分類した。特に発情前期あるいは発情期が5日間連続した場合を持続発情とした。26週齢まで観察後、すべての生存動物はイソフルラン深麻酔による放血殺により安楽死させ生殖器系の臓器を中心に形態学的観察を実施した。

**実験2:** TMXとRLXのエストロゲン作用の有無を確認するため、7週齢の無処置Donryu雌ラットの卵巣を摘出し、2週間後にTMX 10 mg/kg bwあるいはRLX 0.1, 1, 10 mg/kg bwを3日間皮下投与して子宮重量および子宮内膜の形態学的検査を行った(1群5匹)。子宮に対するエストロゲン作用を示し遅発影響発現量であるEE20  $\mu$ g/kgを陽性対照とした。さらにこれらのSERMがEEと同様に視床下部に対してエストロゲン作用を示すか検索するために、AVPVおよびARCのキスペプチンニューロン相当部位のKiss1遺伝子の発現をRT-PCRにて測定した。

**実験3:** 実験に用いたSERMの抗エストロゲン作用を確認するため、7週齢の雌Donryuラットを用いて実験2と同用量のSERMをEE1  $\mu$ g/kg bwとともに3日間連続投与し、子宮重量および子宮内膜の形態学的検索を実施した(1群5例)。また抗エストロゲン作用の陽性対照群としてICH182,780 500  $\mu$ g/kg bwをEE1  $\mu$ g/kg bwとともに3日間投与して比較した。

体重、臓器重量、血中LH濃度、Kiss1関連遺伝子の発現量および膣開口日齢は各群の分散をBartlett法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析、不等分散の場合はKruskal-

Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較検は Dunnett の方法で対照群との間で有意差検定を行った。正常性周期の割合は Fisher の直接確率法で検定した。有意差は 5%とした。

## B-2 .エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の AOP 構築と既存の毒性試験テストガイドライン(TG)への提言

AOP 構築の資料として以下の 3 文献を基本の文献と用いた。

1. OECD. Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways. In Series on Testing and Assessment, No. 184, No1. ENV/JM/MONO(2013)6 p.45, Organisation for Economic Cooperation and Development, Environment Directorate Paris, France. (OECD, 2013)
2. Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, Hecker M, Hutchinson TH, LaLone CA, Landesmann B, Lettieri T, Munn S, Nepelska M, Ottinger MA, Vergauwen L, Whelan M. Adverse outcome pathway (AOP) development I: strategies and principles. Toxicol Sci. 2014 142(2):312-20 (Villeneuve et al., 2014a)
3. Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, Hecker M, Hutchinson TH, LaLone CA, Landesmann B, Lettieri T, Munn S, Nepelska M, Ottinger MA, Vergauwen L, Whelan M. Adverse outcome pathway development II: best practices. Toxicol Sci. 2014 142(2):321-30. (Villeneuve et al., 2014b)

また AOP 構築に用いた遅発影響に関連する文献を Table 1 にまとめた。

化学物質の新生児期曝露により生ずる可能性のある遅発影響を検出するため試験系を組み込む OECD の既存のテストガイドライン (TG)として、

1. 一代繁殖毒性試験(TG415)  
<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741501e.pdf?expires=1456416463&id=id&accname=guest&checksum=4FCF49B246E619F1FCE5795467329900>
2. 二世繁殖毒性試験(TG 416)

<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741601e.pdf?expires=1456416267&id=id&accname=guest&checksum=57F1529FEA951B10093E199E1576F814>

3. 拡張型一代繁殖毒性試験(TG433)  
<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712211e.pdf?expires=1456417694&id=id&accname=guest&checksum=C53E6908857407A1761BF7181B396B64>

についていずれか適切か検討し、どのような検査項目と検出のためのエンドポイント等を組み込むべきか検討した。

(倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

## C . 研究結果

### C-1. SERM 新生児期曝露による遅発影響誘発の可能性とその機序検索

実験 1:投与に関連した症状は観察されなかったが、体重変化において TMX 群では 11 週齢以降軽度な体重の高値で推移した。

**膣開口:** TMX 群と RLX 10mg/kg bw 群で膣開口の早期化および体重の有意な増加が認められた。そのほかの RLX 群は対照群と同様であった。

**性周期:**対照群では 18 週齢まで規則正しい性周期を示したが、その後持続発情を主とする異常周期を示す個体が増加し 26 週齢では正常周期を有する個体は 37.5%であった(Figure 1)。RLX 0.1 および 1 mg/kg bw 群は対照群とほぼ同様に推移した。

RLX10 mg/kg bw 群では早期より持続発情を主とする異常性周期が増加し 12 週齢では対照群に比し有意であった。TMX 群ではその傾向はさらに顕著で、性周期観察開始直後の 7 週齢で全個体が持続発情を示し正常性周期は観察期間を通じて認められなかった。TMX の卵巣では黄体は殆ど観察されなかった。

### 新生児期曝露ラットにおける視床下部キスベプチン関連遺伝子の変化(実験 1) :

Figure 2 に AVPV を含む視床下部前部および ARC を含む後部における Kiss1、Kiss1R、

GnRH mRNA を、ISH により形態学的に測定した Kiss1 陽性細胞数を Figure 3(AVPV)および 4(ARC)に、ホルモン測定結果を Figure5 に示す。

視床下部前部の Kiss1 は RLX 投与では 10mg 群のみで有意差はないものの軽度に、TMX10 では明らかに低下し、RLX 群では変化が認められなかった視床下部後部でも TMX10 では明らかに低下していた。GnRH1 および Kiss1R はいずれの投与あるいは部位においても差は認められなかった。

ISH の染色結果より、AVPV の Kiss1 陽性細胞数が RLX10 および TMX10 で有意に低下し、TMX 投与で顕著であった。ARC では TMX 投与のみで有意に低下した。

LH サージ時の LH 値が RLX10 および TMX10 で有意に低下、FSH は TMX 群のみで低下した。TMX におけるこれらの低下は顕著であった。

#### **RLX および TMX の子宮に対するエストロゲン/抗エストロゲン作用および視床下部キス**

**ペプチンに対するエストロゲン作用(実験 2,3)**  
RLX および TMX の子宮に対するエストロゲンおよび抗エストロゲン作用を Figure 6 の A,B に、視床下部前部および後部の Kiss1 mRNA の変化を C に示した。

RLX 群には子宮に対するエストロゲン作用はなく、TMX10 のエストロゲン作用は非常に弱かった。RLX 全投与群および TMX とともに子宮に対する強い抗エストロゲン作用が認められた。RLX 全投与群および TMX 投与とともに無処置成熟動物の視床下部前部および後部の Kiss1 発現量を増加させなかった。

#### **C-2. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の AOP を構築および TG 改善への提言**

Table1 にエストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響に関する文献および本研究結果を基に、AOP の各構成となる候補を以下に列記した。

##### **1. 新生児期 EE 曝露による遅発影響による基本の遺伝子変化(MIE, Molecular Initiating Event)の候補**

- 1) 性周期を司る視床下部のサージ中枢 AVPV におけるキスペプチン陽性細胞数低下

- 2) 卵胞発育を司る視床下部パルス中枢 ARC におけるキスペプチン陽性細胞数低下

##### **2. 遅発影響において必須の変化(Key Event, KE)の候補**

- 1) 成熟後の LH サージ時における LH レベルの低下
- 2) 成熟後の LH サージ時における FSH レベルの低下

##### **3. 遅発影響 Adverse outcome (AO)の候補**

- 1) 性周期の早期異常(主として持続発情の持続)の発現。ただし成熟後初期に性周期異常のものは脱雌化であるので除外した。

##### **4. 既存の毒性試験 TG への提言については考察にまとめて記載した。**

#### **D. 考察**

##### **D-1. SERM 新生児期曝露による遅発影響誘発の可能性とその機序検索**

得られた結果より以下のように考察した。

1. RLX10 投与で明瞭な性周期異常早期発現が認められたことより、RLX の新生児期曝露は遅発影響を誘発し、その発現は用量依存性である可能性が考えられた。また遅発影響発現量の RLX10 は視床下部前部の Kiss1 mRNA 発現の低下、AVPV における Kiss1 陽性細胞数減少やサージ時の LH 低下等、エストロゲン新生児曝露と同様の結果が得られたことから (Ichimura et al., 2015)、RLX 新生児期曝露による遅発影響も AVPV におけるキスペプチンニューロンの変化が引き金であると推察した。
2. TMX 新生児期曝露による性成熟後早期からの性周期異常、AVPV および ARC における顕著な Kiss1 陽性細胞数の低下、LH サージ時の顕著な LH および FSH 低下および卵巣における黄体の欠如は、高用量のエストロゲン新生児期曝露により誘発された脱雌化と同様の結果である。したがって本実験の投与量の TMX の新生児曝露は、エストロゲン作用物質の同様、脱雌化を引き起こしている可能性が示唆された。遅発影響の発現は用量や投与時期との相関性があることが Takahashi ら(2013) や Ichimura ら(2015)で報告されていることから、さらに低い用量の TMX 新生児期曝露では遅発影響が誘発される可能性が示唆された。
3. 今回の投与量の TMX および RLX は子宮

に対しては明らかな抗エストロゲン作用を示し、成熟後の正常動物の視床下部キスペプチンを変動させなかった。この結果は、TMXあるいはRLXは新生児期にはエストロゲンと同様の機序で視床下部に作用し、遅発影響を起こすと考えられる一方、成熟後においてはエストロゲン様物質として視床下部に作用しないことを示唆している。

これら1~3の結果から、SERM新生児期曝露により生じた遅発影響は、TMXおよびRLXが新生児期の視床下部のERあるいはその下流に対してエストロゲンと同様の作用として働いていると考えられた。

しかし成熟後ではこれらの物質の視床下部に対してエストロゲン様作用を示さないことから新生児と成熟後は視床下部のERあるいはその下流における感受性は異なっていることが示唆された。

また今回の研究結果で遅発影響は、子宮肥大試験で陽性となる物質だけでなく、抗エストロゲン物質でも誘発されたこと、新生児期と成熟後で、あるいは組織間でER感受性が異なっていたことから、遅発影響誘発物質の確定に子宮肥大試験が必ずしも高感受性でない可能性が導き出された。しかし、まず成熟動物を用いた子宮肥大試験の応用は、ERに結合する物質のスクリーニング法として有用であると考えられる。

## D-2. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響のAOP構築とTG改善への提言

AVPVにおけるKiss1陽性細胞(キスペプチンニューロンと考えられる)が血中のエストロゲン濃度の変化をエストロゲン受容体を介して感知しLHサージを制御していると考えられていることから、新生児期遅発影響のMIEであると考えられた。

本研究結果よりMIEを誘発する化学物質はエストロゲン作用物質だけでなく、抗エストロゲン作用物質も含まれることから、誘発物質はER結合物質とすることが適切であると考えられた。

しかし候補に挙げた変化のうち、視床下部ARCにおけるキスペプチンの低下は遅発影響量より、さらに高用量で誘発される脱雌化で

も観察されることから、KEから外した。

KEとして、性周期が正常時にすでに発現するLHサージ時のLH低下は、異常性周期の発現に先駆けて生ずる事象であることから遅発影響のKEとして挙げた。

FSHの低下を伴うLHの顕著な低下はすでに性周期が回帰していない状態を示すことから遅発影響のKEとして適切ではないと考えられた。

性周期異常の発現時期の早期化は正常動物でも加齢に伴い生ずる加齢性の変化である。しかしこの異常が早期に発現することは個体の繁殖性を短縮すること、また後述するように子宮癌のリスクを上昇させることから、性周期異常の発現時期早期化は動物だけでなく哺乳類にとって悪影響であると考えられる。また本研究では、種々の系統ラットの新生児期EE曝露で認められていることから遅発影響を示す最も確実に感受性の高いKEであると考えられた(Takahashi et al., 2013; Shirota et al., 2013; Usuda et al., 2013)。またこの性周期異常の発現時期の早期化は、新生児期EE曝露量との明確な用量相関性があり、生殖寿命の短縮に直結することから、遅発影響のAOとして挙げるのが適切と考えられた。

性周期異常の発現時期の早期化に伴い生ずる間接的な影響として、早期に排卵が停止するためエストロゲンに対しプロゲステロンがより低下するという相対的高エストロゲン状態をもたらした結果、子宮がんの増加する可能性がある。生体にとって有害な遅発影響であるが、比較的高用量で生ずることから遅発影響のAOとしては必須の項目ではないと考えられた。

遅発影響のAOPに至る流れ図として、エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露

視床下部サージ中枢視床下部キスペプチン陽性細胞数低下(MIE)

LHサージ低下(KE)

性周期異常の発現時期の早期化(KE)

繁殖生涯への悪影響(AO)/子宮癌リスク増加(AO)が考えられた。研究成果を盛り込んだ概念図を Figure 7 に示した。

### 既存の毒性試験 TG への提言

遅発影響の最も感受性が高く確実なエンドポイントが性周期観察による性周期異常の発現時期早期化であることから、同項目をエンドポイントとすることを提言する。観察期間については、エストロゲン作用が弱い物質の場合は性周期異常の発現時期早期化の時期が遅れ、5~6ヶ月齢でようやく対照群と有意差が認められることから(Takahashi et al., 2013)、観察期間は生後6ヶ月までが必要であると考えられた。

3つのTG内容を比較した結果、最も汎用されている二世世代繁殖毒性試験(TG416)を用い、F0世代に性周期を長期観察用の衛星群を設置することを提言する。1群あたりの匹数として、対照群であっても性周期異常が加齢とともに発現するので統計学的有意差を出すためには一定の動物数が必要なことを鑑み、1群20例以上を推奨したい。また一世世代繁殖毒性試験(TG415)、あるいは拡張型1世代繁殖毒性試験(TG443)についても、2世代繁殖毒性試験と同様、F0世代に長期性周期観察用の衛星群を設けることにより遅発影響の検出への対応が可能であると提言する。

遅発影響を確認すべき物質としては、その物質の作用機序あるいは既知の毒性プロファイルより、ERと結合する物質、すなわちエストロゲン作用/抗エストロゲン作用が強く疑われる物質が対象である。用量についてはエストロゲン作用を示す用量を含めて用量設定し、遅発影響が認められる用量および認められない用量を含むことが望ましいと提言する。このような追加の衛星群を設けることで遅発影響は検出可能であると考えられる。

### E. 結論

1. SERMであるTMXあるいはRLXをラット新生児期に単回曝露した結果、エストロゲン物質と同様、視床下部キスペプチンニューロンを変調させ神経内分泌機能の異常を介してRLXでは遅発影響が誘発され、TMXでは

脱雌化が認められた。

2. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響のAOPとして、initiating molecular eventとしてサージ中枢視床下部キスペプチンニューロン抑制→key events: LHサージ低下→AO:性周期異常早期化(繁殖寿命への悪影響)を提案予定である。既存のTGに追加の衛星群を設けることで遅発影響は検出可能であると考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17alpha-Ethinylestradiol. *Biol Reprod.*, **93**, 32, 2015.
- 2) Yoshida M, Katashima S, Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Taya K, Watanabe G.: Predominant role of the hypothalamic-pituitary axis, not the ovary, in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose p-tert-octylphenol in rats. *Reprod Toxicol.* **57**, 21-28, 2015.
- 3) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17alpha-ethinylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Repro. Toxicol.*, **60**, 33-38, 2016.
- 4) Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Effects of sulpiride and ethylene glycol monomethyl ether on endometrial carcinogenicity in Donryu rats. *J Appl Toxicol.* Online Jul 14 2015.

#### 2. 学会発表

高橋美和、市村亮平、井上薫、森川朋美、渡辺元、吉田緑：17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE)新生児期曝露による発達期視床下部の kiss1 発現低下：第42回日本毒性学会学術年会 (2015.6)

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 参考文献

Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha-ethinylestradiol on the estrous cycle



and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, **40**, 16-23, 2013.

Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol in female rats. *Reprod Toxicol*, **51**, 145-156, 2015a.

Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17alpha-ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH surge level in female rats. *J. Vet. Med. Sci.* **76**(8): 1105–1110, 2014

Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17alpha-Ethinylestradiol. *Biol Reprod.*, **93**, 32, 2015b.

Pinilla L, González LC, Gaytán F, Tena-Sempere M, Aguilar E. Oestrogenic effects of neonatal administration of raloxifene on hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male and female rats. *Reproduction* **121**, 915-24. 2001.

Pinilla L, Barreiro ML, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Aguilar E. Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat. *J Endocrinol.*, **172**, 441-448, 2002.

OECD. Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways. In Series on Testing and Assessment, No. 184, NoI. ENV/JM/MONO(2013)6 p.45, Organisation for Economic Cooperation and Development, Environment Directorate Paris, France

Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, Hecker M, Hutchinson TH, LaLone CA, Landesmann B, Lettieri T, Munn S, Nepelska M, Ottinger MA, Vergauwen L, Whelan M. Adverse outcome pathway (AOP) development I: strategies and principles. *Toxicol Sci.* 2014b 142(2):312-20.

Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, Hecker M, Hutchinson TH, LaLone CA, Landesmann B, Lettieri T, Munn S, Nepelska M, Ottinger MA, Vergauwen L, Whelan M. Adverse outcome pathway development II: best practices. *Toxicol Sci.* 2014a, 142(2):321-30.

Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, **39**, 775-784, 2014.

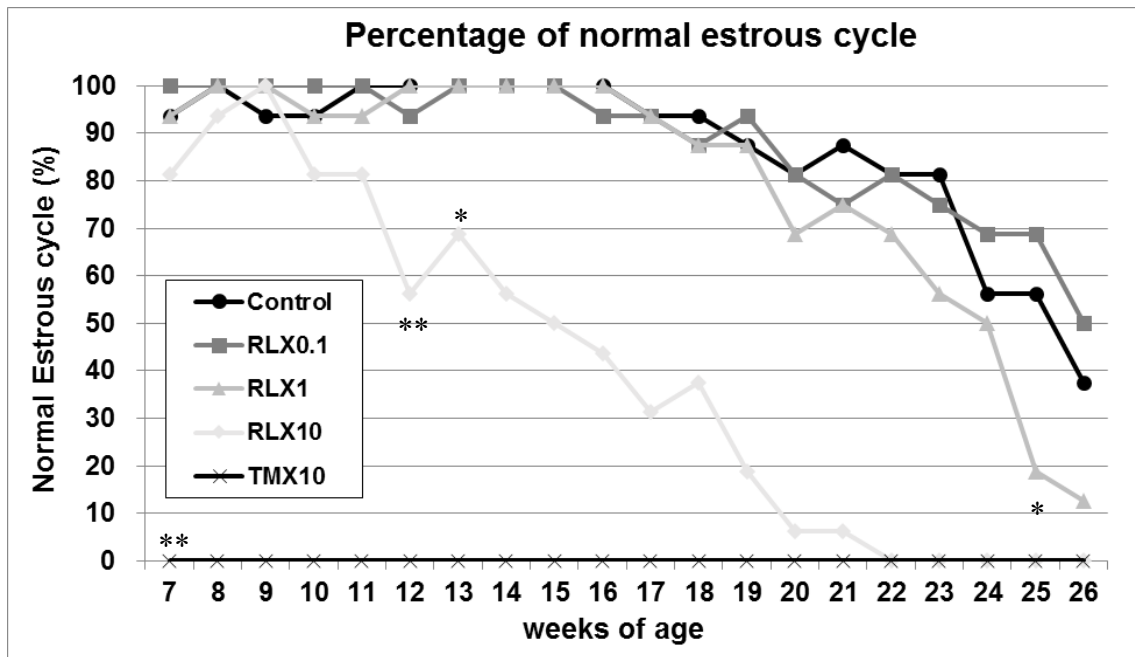


Figure 1. 正常性周期を示す個体の割合の推移

**AVPVを含む視床下部前方**

**ARCを含む視床下部後方**

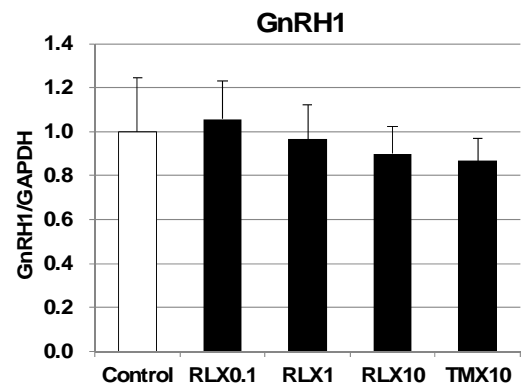
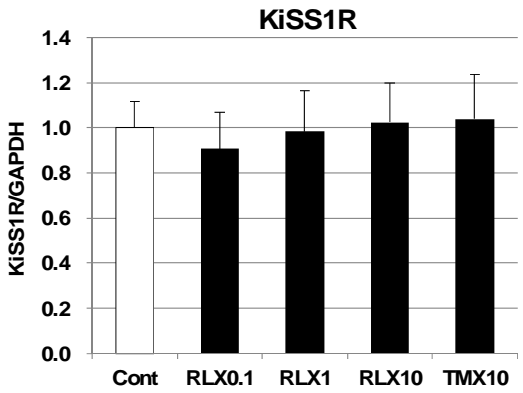
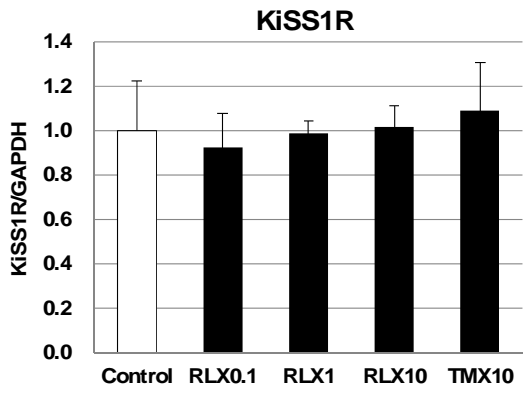
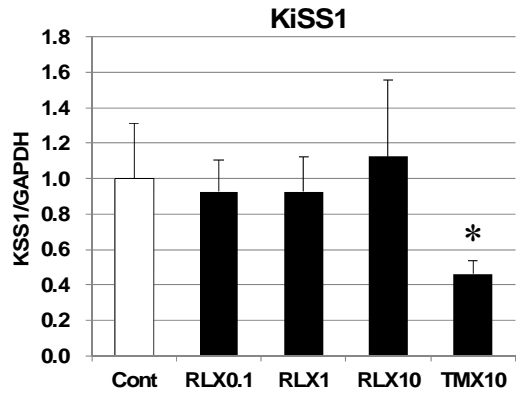
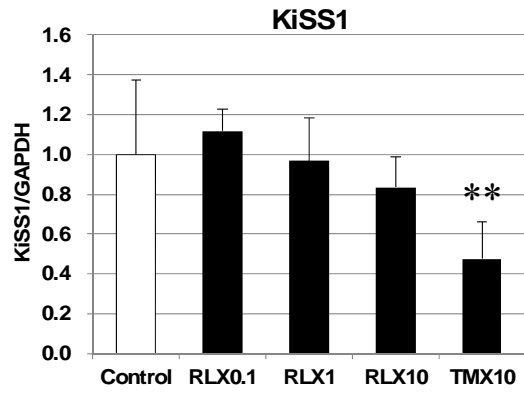


Figure 2 AVPVおよびARCにおけるKiss1, Kiss1RおよびGnRH (AVPVのみ)mRNAの発現

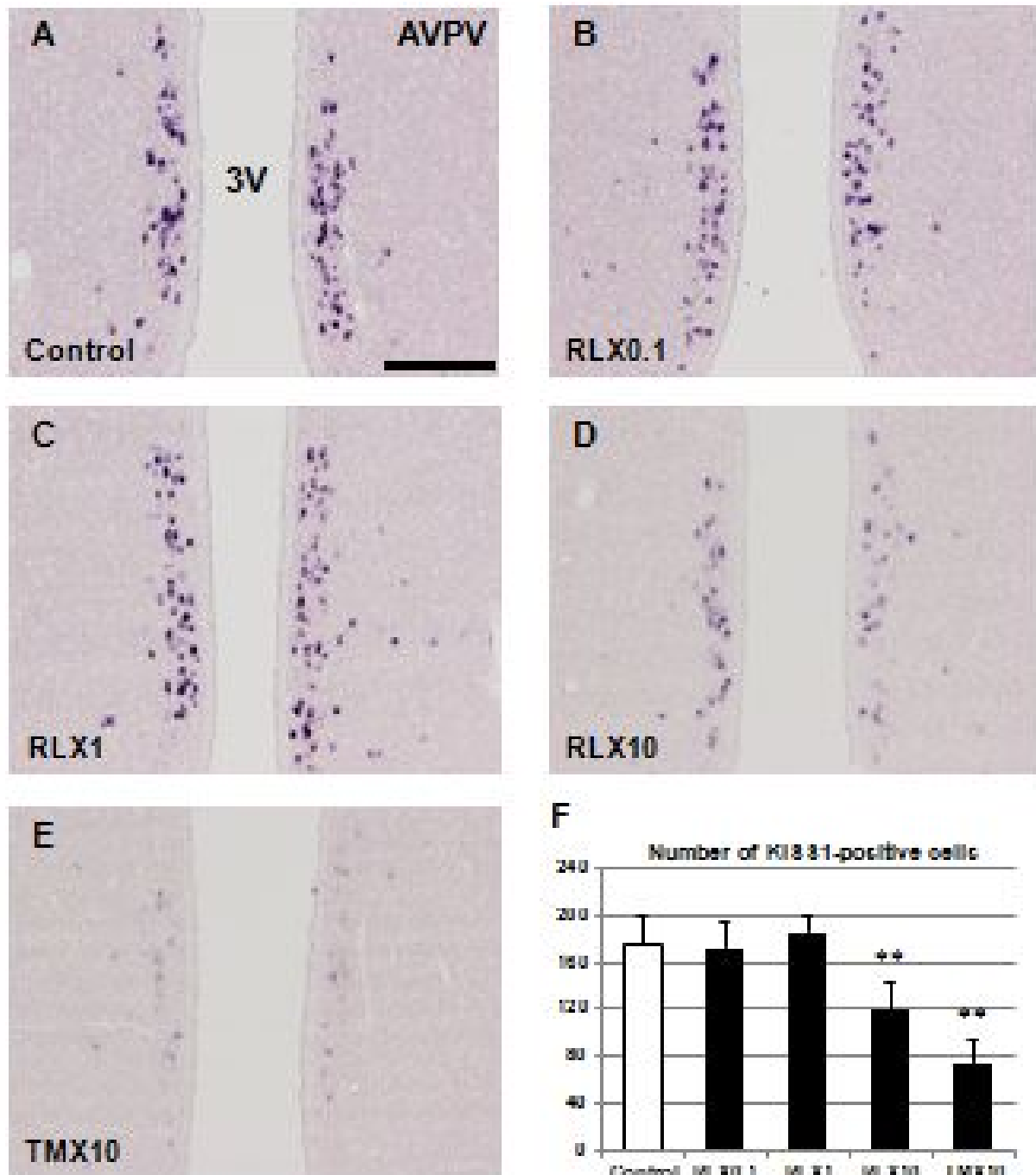


Figure 3. AVPVを含む視床下部前方におけるISHによるKiss1発現細胞の比較

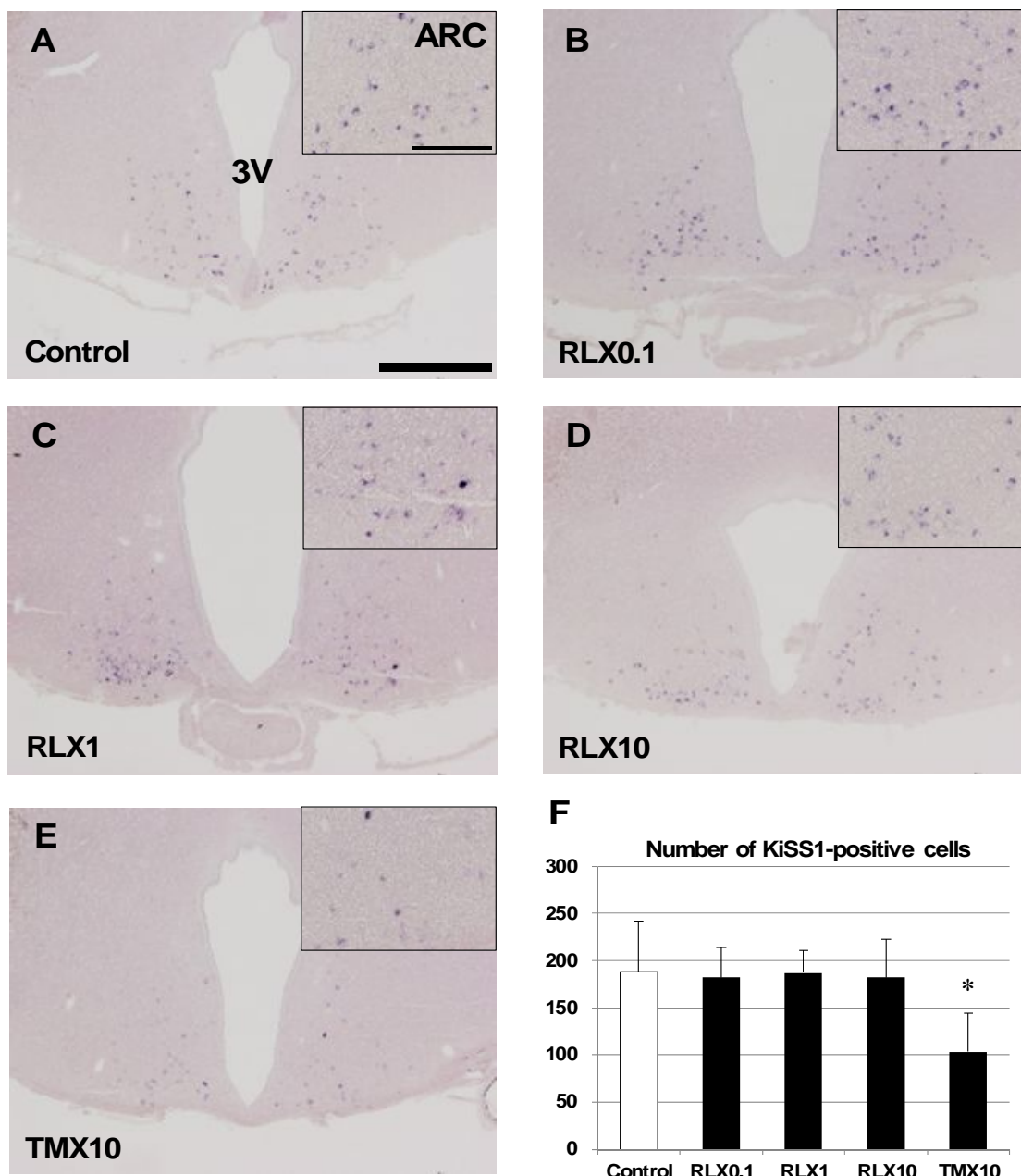


Figure 4. ARCを含む視床下部後方におけるISHによるKiss1発現細胞の比較

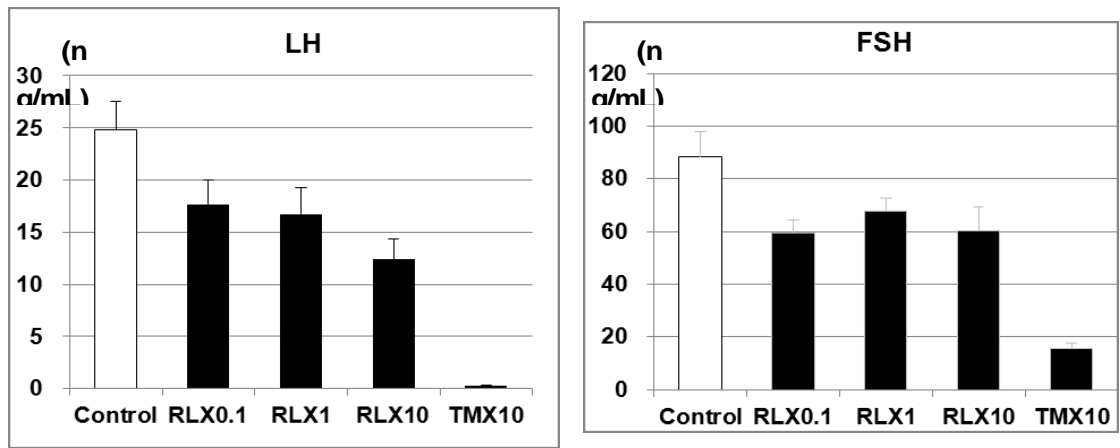


Figure 5. 誘発LHサージ時の血中LHおよびFSH値

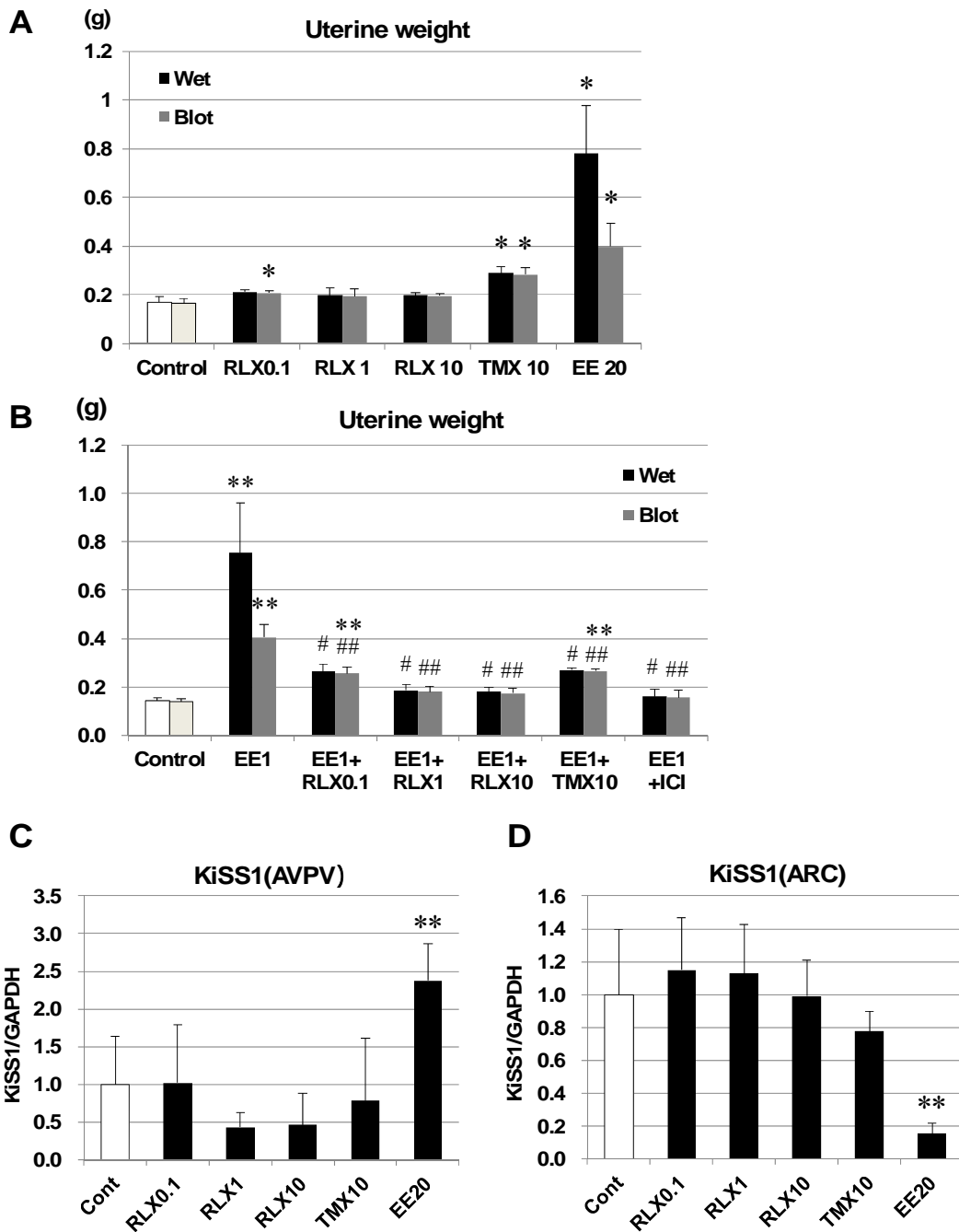


Figure 6. 成熟ラットの子宮に対するTMXとRLXのエストロゲン/抗エストロゲン作用および視床下部に対するエストロゲン作用

Table 1 遅発影響AOP構築に用いた文献および本研究成果から得られた各指標

番号	文献	視床下部 キスベプ チンの低 下	L H サ ー ジ 低 下	異常 性周 期早 期発 現	その他
1	Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha- ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. <i>Reprod Toxicol.</i> , <b>40</b> , 16-23, 2013.	(AVPV, ARC込)			子宮がんの増加傾向
2	Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha- ethynylestradiol in female rats. <i>Reprod Toxicol</i> , <b>51</b> , 145-156, 2015.	(AVPV)			KiSS1/ER*陽性細胞の減少
3	Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH surge level in female rats. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> <b>76</b> (8): 1105–1110, 2014	(AVPV)			
4	Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. <i>J Toxicol Sci.</i> , <b>39</b> , 775-784, 2014.	(AVPV)			離乳まで
5	Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. <i>J Toxicol Sci</i> <b>2012</b> ;37:681-90.				経口投与でも同様
6	Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17alpha- Ethynylestradiol. <i>Biol Reprod.</i> , <b>93</b> , 32, 2015.	(AVPV)			生後10日齢で遅発影響



7	Yoshida M, Katashima S, Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Taya K, Watanabe G.: Predominant role of the hypothalamic-pituitary axis, not the ovary, in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose p-tert-octylphenol in rats. <i>Reprod Toxicol.</i> 57, 21-28, 2015.				卵巣交換で遅発影響は中枢影響を確認
8	Gore AC, Walker DM, Zama AM, Armenti AE, Uzumcu M. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. <i>Mol Endocrinol</i> 2011;25:2157-68.				
9	Yoshida M, Katsuda S, Tanimoto T, Asai S, Nakae D, Kurokawa Y, Taya K, Maekawa A. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-t-octylphenol for different periods. <i>Carcinogenesis</i> 2002;23:1745-50.				子宮癌増加
10	Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. <i>Toxicol Pathol</i> 2011;39:823-34.				子宮癌増加
11	Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA. Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. <i>Trends Neurosci</i> 2007;30:504-11.				視床下部キスペプチンが繁殖生理を制御
12	Maeda K, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H. Metastin/kisspeptin and control of estrous cycle in rats. <i>Rev Endocr Metab Disord</i> 2007;8:21-9.				AVPVのキスペプチンが性周期を制御
13	Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. <i>Endocrinology</i> 2006;147:1154-8.				AVPV,ARCのキスペプチンがサージ、パルス中枢を各々制御

# 遅発影響のAOP

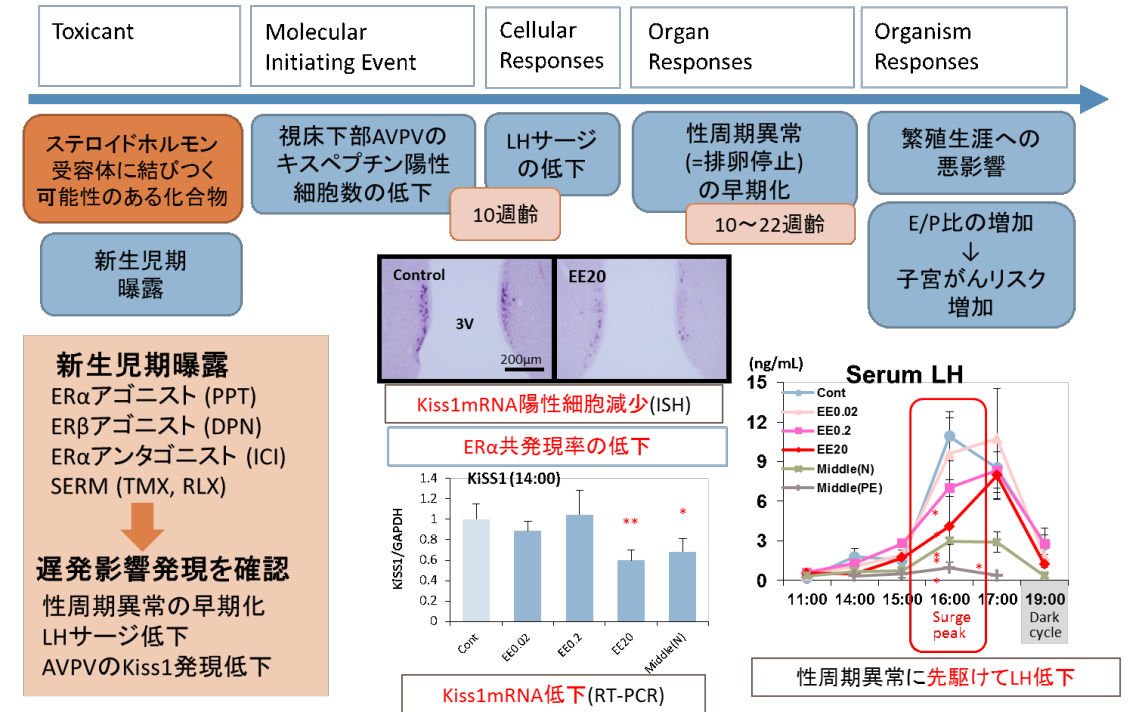


Figure 7. 遅発影響のAOP